

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/40, 1/42, 1/00, 1/48	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/02570 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Januar 1998 (22.01.98)
--	----	--

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/03750

(22) Internationales Anmeldedatum: 14. Juli 1997 (14.07.97)

(30) Prioritätsdaten:
196 28 484.8 15. Juli 1996 (15.07.96) DE(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer
Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SIEDEL, Joachim [DE/DE];
Hofmairstrasse 19, D-82327 Tutzing (DE). TOWN, Michael,
Harold [GB/DE]; Waldstrasse 45, D-82386 Oberhausen
(DE). BIRKNER, Christian [DE/DE]; Willingstrasse 9, D-
82449 Uffing (DE).(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-
81679 München (DE).(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT,
BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

Veröffentlicht

*Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.*

(54) Title: BLOOD SUBSTITUTE SUPPRESSION BY PEROXIDES

(54) Bezeichnung: BLUTERSATZMITTEL-ENTSTÖRUNG DURCH PEROXIDE

(57) Abstract

The invention relates to a process for removal and/or reduction of disorders which are caused by the presence of free haemoglobin while determining an analyte in a sample by optical measurement. One or a plurality of peroxide compounds are added to the analytical reagent or a part thereof before measurement. The invention also relates to a reagent kit which contains at least one peroxide compound.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Beseitigung oder/und Verminderung von Störungen, die durch Anwesenheit von freiem Hämoglobin hervorgerufen werden, bei der Bestimmung eines Analyten in einer Probe durch optische Messung, wobei man dem Analysenreagenz oder einem Teil davon vor der Messung eine oder mehrere peroxidische Verbindungen zusetzt. Weiterhin wird ein Reagenzienkit offenbart, der mindestens eine peroxidische Verbindung enthält.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland		
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Blutersatzmittel-Entstörung durch Peroxide

Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer freies Hämoglobin enthaltenden Probe durch optische Messung unter Zusatz eines Aufhellmittels zum Analysenreagenz. Insbesondere ist dieses Verfahren zur Bestimmung
10 von Bestandteilen einer medizinischen Probe wie etwa der Parameter α -Amylase, Alkalische Phosphatase und γ -Glutamyl-Transferase in einer Blut-, Serum- oder Plasmaprobe geeignet.

Gerade bei der Bestimmung klinisch-diagnostisch relevanter
15 Bestandteile in Blut-, Serum- bzw. Plasmaproben kommt es häufig vor, daß diese Probenmaterialien freies Hämoglobin enthalten, d.h. hämolytisch sind. Dabei kann die Hämolyse entweder die Folge von aus Erythrozyten freigesetztem nativem Hämoglobin oder der therapeutischen Anwendung von Blutersatzmitteln
20 auf Basis nichtzellulärer Hämoglobinderivate sein.

Speziell bei Verwendung von photometrischer Bestimmungsmethoden ist in vielen Fällen die Analyse solcher Hämoglobin enthaltender Proben im wesentlichen aufgrund der spektralen Eigenschaften von Hämoglobin bzw. Hämoglobinderivaten gestört
25 oder gänzlich unmöglich. Dies gilt insbesondere dann, wenn die photometrische Messung mit einer Wellenlänge durchgeführt wird, bei der eine starke Absorption von Hämoglobin stattfindet, beispielsweise bei Wellenlängen zwischen ca. 400 - 420 nm
30 und wenn gleichzeitig ein hoher Hämoglobingehalt in der Probe, d.h. üblicherweise > 500 mg/dl vorliegt.

Die Frage nach der Beseitigung solcher durch Hämolyse verursachten Analysenstörungen stellt sich mit der Verfügbarkeit
35 von Blutersatzmitteln auf Basis von Hämoglobinderivaten in weitaus stärkerem Maße als bisher. Nach ihrer therapeutischen Verabreichung können im Blut-Serum oder -Plasma Hämoglobin-

Spiegel von bis zu ca. 2000 mg/dl auftreten, wobei erschwerend hinzukommt, daß sich in diesem Fall das Vorhandensein von freiem Hämoglobin in der Probe auch nicht durch geeignete Vorsichtsmaßnahmen bei der Serum- bzw. Plasma-Gewinnung aus
5 der Blutprobe vermeiden läßt.

Es besteht daher ein Bedarf an einem Verfahren, welches es ermöglicht, auch in stark hämolytischen, beispielsweise Blut-ersatzmittel bis zu Konzentrationen von mindestens 2000 mg/dl
10 enthaltenden Serum- bzw. Plasmaproben störungsfrei photometrische Bestimmungen diagnostisch wichtiger Analyten durchführen zu können.

Gelöst wurde die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch
15 ein Verfahren zur Beseitigung oder/und Verminderung von Störungen, die durch Anwesenheit von freiem Hämoglobin hervorgerufen werden, bei der Bestimmung eines Analyten in einer Probe durch optische Messung, wobei man dem für die Bestimmung des Analyten verwendeten Reagenz oder einem Teil davon eine
20 oder mehrere peroxidische Verbindungen zusetzt.

Durch den erfindungsgemäßen Zusatz von peroxidischen Verbindungen zum Analysereagenz oder einem oder mehreren Teilreagenzien können einerseits spektrale Störungen durch das in der
25 Probe vorhandene Hämoglobin beseitigt werden. Andererseits können auch Störungen beseitigt werden, die durch Wechselwirkungen von Hämoglobin mit in der Probe vorhandenen weiteren Substanzen auftreten.

30 Das Reagenz, welches der Probe zugesetzt wird, kann in flüssiger oder fester Form vorliegen. Für Analytbestimmungen, die in flüssiger Phase durchgeführt werden, wird man vorzugsweise der Probe auch ein flüssiges Reagenz zusetzen. Bei Trockentests kann das Reagenz aber auch in fester Form, z.B. in Form von
35 imprägnierten Fasern oder Vliesen vorliegen.

Als peroxidische Substanzen kommen sowohl anorganische als

auch organische Peroxide in Frage. Bevorzugt sind anorganische peroxidische Verbindungen wie etwa H_2O_2 , Peroxide, Perborate, Persulfate, Peroxodisulfate, Percarbonate etc. Besonders bevorzugt werden die peroxidischen Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus H_2O_2 und Perboraten wie etwa $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ bzw. $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$.

Die Endkonzentration der peroxidischen Verbindungen im Testansatz kann über einen breiten Bereich variiert werden. Sie beträgt vorzugsweise 1 - 500 mmol/l und besonders bevorzugt 5 - 200 mmol/l bezogen auf den Gehalt an O_2^{2-} im Testansatz.

Durch den Zusatz peroxidischer Verbindungen kommt es nach dem Vermischen der Probe mit dem Analysenreagenz zu einer raschen Ausbleichung der vom Hämoglobin bzw. Hämoglobinderivat hervorgerufenen Färbung, ohne daß gleichzeitig eine sich im selben Reaktionsansatz anschließende Bestimmung des Analyten wie z.B. eines Enzyms mittels chromogener Substrate signifikant beeinträchtigt wird. Dieser Befund ist sehr überraschend, da keinesfalls vorhergesehen werden konnte, daß peroxidische Verbindungen auch in höheren Konzentrationen sowie innerhalb des für photometrische Serum- bzw. Plasmaanalysen üblicherweise verwendeten Temperaturbereichs, d.h. im allgemeinen von 25 - 37°C, auch über eine längere Einwirkungszeit, d.h. vorzugsweise über mindestens 1 min und besonders bevorzugt über mindestens 2 - 10 min hinweg keine Beeinflussung von enzymatischen Aktivitäten und/oder eine Störung der jeweiligen Indikatorreaktion verursachen.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere für optische Messungen, die bei mindestens einer Meßwellenlänge durchgeführt werden, bei der natives Hämoglobin bzw. synthetische Hämoglobinderivate eine Absorption aufweisen. Besonders bevorzugt wird das Verfahren bei optischen Messungen in den Meßwellenlängenbereichen von etwa 380-450 nm und insbesondere von 400 - 420 nm oder/und 520-590 nm durchgeführt, wo Hämoglobin seine Haupt- bzw. Nebenabsorptionen aufweist.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Bestimmung beliebiger Proben, in denen freies Hämoglobin vorliegt. Beispiele für solche Proben sind nativ hämolytische Blut-, Serum- oder Plasmaproben oder Proben, die ein Blutersatzmittel auf Basis von Hämoglobinderivaten enthalten. Beispiele für Blutersatzmittel, die im Sinne der vorliegenden Erfindung unter dem Begriff "freies Hämoglobin" fallen, sind modifizierte oder intramolekular oder intermolekular vernetzte bzw. polymerisierte Derivate von Hämoglobinen, insbesondere von Humanhämoglobin oder Rinderhämoglobin, z.B. DCL-Hämoglobin (Diaspirin-Crosslinked-Hämoglobin), sowie rekombinant z.B. aus Mikroorganismen gewonnene Hämoglobin-Muteine (vgl. z.B. "Blood Substitutes", R.M.Winslow, K.D.Vandegriff, M.Intaglietta (Hrsg.), Birkhäuser, Boston 1995 und EP-A-0700 997).

15 In einer bestimmten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens handelt es sich bei dem zu bestimmenden Analyten um ein Enzym. Bevorzugte Enzyme sind ausgewählt aus der Gruppe der Hydrolasen wie z.B. α -Amylase, Alkalische Phosphatase und
20 γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT). Darüberhinaus ist das erfindungsgemäße Verfahren auch zur Bestimmung anderer Analyten geeignet.

Als Probe beim erfindungsgemäßen Verfahren wird vorzugsweise
25 eine medizinische Probe, z.B. eine Blut-, Serum- oder Plasma-
probe eingesetzt, insbesondere eine humane Serum- oder Plasma-
probe.

Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß es in einem Analyseautomaten durchgeführt werden kann, z.B. an einem Boehringer Mannheim/Hitachi 704- oder 717-Analysegerät.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Bestimmung des
35 Analyten im erfindungsgemäßen Verfahren als Mehr-Schritt-Test, z.B. als Zwei-Schritt-Test durchgeführt, wobei der Probe nacheinander mindestens zwei Teilreagenzien zu unterschiedlichen

Zeitpunkten zugesetzt werden. Bei einer solchen Mehr-Schritt-Testführung werden die peroxidischen Verbindungen vorzugsweise dem Teilreagenz zugefügt, das als erstes der Probe zugesetzt wird. Die eigentliche Analytbestimmung erfolgt dann vorzugsweise frühestens nach Zugabe des zweiten Teilreagenzes, das z.B. im Falle einer Enzymbestimmung ein chromogenes Farbsubstrat enthalten kann.

Wenn bei einer Mehr-Schritt-Testführung die peroxidischen Verbindungen zusammen mit einem ersten Teilreagenz zugesetzt werden, können das zweite oder mindestens eines der weiteren Teilreagenzien dann gegebenenfalls noch ein Mittel enthalten, mit dem die aus dem ersten Teilreagenz stammenden überschüssigen peroxidischen Verbindungen wieder entfernt werden, um die etwaigen Störungen von anderen, im gleichen Reaktionsgefäß anschließend durchgeführten Analysen aufgrund von sogenannten Verschleppungseffekten zu vermeiden.

Werden als Peroxide H_2O_2 oder/und Perbörates eingesetzt, so umfaßt das Mittel zur Entfernung der peroxidischen Verbindungen vorzugsweise ein Peroxid-umsetzendes Enzym wie etwa Katalase oder/und Peroxidase gegebenenfalls zusammen mit einem oder mehreren geeigneten Substraten des Peroxid-umsetzenden Enzyms.

Weiterhin kann dem Analysenreagenz oder einem Teilreagenz davon zur Vermeidung der Bildung von Superoxidradikalen O_2^- noch Superoxiddismutase zugesetzt werden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann ohne weitere Maßnahmen eine Wiederfindung des nachzuweisenden Analyten auch in hämolytischen Proben von $100 \pm 10\%$ und vorzugsweise $100 \pm 5\%$ erreicht werden, wenn zum ersten Meßzeitpunkt die Ausbleichung von Hämoglobin oder Hämoglobinderivat durch die peroxidischen Verbindungen im wesentlichen vollständig abgeschlossen oder zum Stillstand gekommen ist. Ist dagegen die Ausbleichreaktion zu Beginn der Messung noch nicht zum Stillstand gekommen, was

gegebenenfalls bei einer sehr hohen Hämoglobin-Konzentration in der Probe und/oder einem verhältnismäßig hohen Probe- zu Reagenz-Volumenverhältnis der Fall sein kann, so kann zum Erreichen der gewünschten Analysengenauigkeit bevorzugt noch
5 eine Leewertkorrektur durchgeführt werden. Diese Leewertkorrektur kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß man von dem Meßsignal, welches mit dem peroxid- und chromogenhaltigen Reagenz erhalten wird, das Leewertsignal abzieht, welches im gleichen Meßzeitraum in einem parallelen Testansatz mit dem
10 ebenfalls peroxidhaltigen, jedoch chromogenfreien Reagenz erhalten wird. Besonders bevorzugt erfolgt die Leewertkorrektur durch Abziehen eines kinetischen Leewerts.

Bei einem Zwei-Schritt-Test erfolgt die Bestimmung des Leewerts vorzugsweise derart, daß ein peroxidhaltiges erstes
15 Teilreagenz (R1), vorzugsweise ein Reagenz mit gleicher Peroxidkonzentration wie im Testansatz, und nachfolgend ein chromogenfreies zweites Teilreagenz (R2) zur Probe gegeben wird und aus diesem Testansatz dann der vom Meßsignal abzuziehende
20 Leewert ermittelt wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Reagenzienkit zur Bestimmung eines Analyten in einer Probe durch optische Messung, der neben den zur Analytbestimmung
25 erforderlichen Komponenten mindestens eine peroxidische Verbindung zur Beseitigung oder/und Verminderung von Störungen, die durch freies Hämoglobin hervorgerufen werden, enthält. Vorzugsweise besteht der Reagenzienkit aus mindestens zwei räumlich voneinander getrennten Teilreagenzien. Ein Teilreagenz
30 enthält vorzugsweise die peroxidische Verbindung getrennt von allen anderen Komponenten. In diesem Teilreagenz kann die peroxidische Verbindung in fester oder flüssiger Form, z.B. als Pulver oder Tablette oder auch als stabilisierte Lösung vorliegen. Das die peroxidische Verbindung enthaltende Teil-
35 reagenz wird vor der Durchführung des Tests vorzugsweise mit einem weiteren Teilreagenz vermischt.

Ein erfindungsgemäßer Reagenzienkit zur Bestimmung von Enzymen enthält vorzugsweise ein erstes die peroxidische Verbindung enthaltendes Teilreagenz, ein weiteres mit der peroxidischen Verbindung mischbares Teilreagenz und ein separates Reagenz, 5 welches ein chromogenes Farbsubstrat enthält.

Ein erfindungsgemäßer Reagenzienkit zur Bestimmung von α -Amylase umfaßt vorzugsweise ein erstes Teilreagenz, welches die peroxidische Verbindung enthält, ein weiteres mit der peroxi- 10 dischen Verbindung kompatibles Teilreagenz, welches gegebenenfalls ein α -Amylase-Hilfsenzym wie etwa α -Glucosidase oder/und einen Antikörper enthält, sowie ein weiteres Teilreagenz, das ein chromogenes α -Amylasesubstrat, beispielsweise ein oligomeres Glucosid enthält.

15

Ein erfindungsgemäßer Reagenzienkit zur Bestimmung von alkalischer Phosphatase umfaßt vorzugsweise ein erstes, die peroxidische Verbindung enthaltendes Teilreagenz. Ein weiteres Teilreagenz, welches mit dem ersten Teilreagenz kompatibel ist, 20 enthält vorzugsweise einen geeigneten alkalischen Puffer, und ein weiteres Teilreagenz, enthält ein chromogenes Substrat der Alkalischen Phosphatase, z.B. einen Phosphatester wie etwa 4-Nitrophenylphosphat.

25 Ein erfindungsgemäßer Reagenzienkit zur Bestimmung von γ -Glutamyltransferase umfaßt vorzugsweise ein erstes, die peroxidische Verbindung enthaltendes Teilreagenz, ein zweites Teilreagenz, welches einen geeigneten Puffer enthält, und ein weiteres Teilreagenz, das ein chromogenes Substrat der γ -GT, 30 z.B. L- γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid enthält.

Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch die beigefügten Abbildungen sowie die nachfolgenden Beispiele erläutert werden.

35

Es zeigen:

- Abb. 1 den zeitlichen Verlauf des Meßsignals bei einer Bestimmung von Alkalischer Phosphatase in Proben mit unterschiedlichen Gehalten an Hämoglobinderivat ohne Zusatz einer peroxidischen Verbindung;
- 5 Abb. 2 den zeitlichen Verlauf des Meßsignals bei einer Bestimmung von Alkalischer Phosphatase in Proben mit unterschiedlichen Gehalten an Hämoglobinderivat unter Zusatz einer peroxidischen Verbindung (1-4) bzw. den zeitlichen Verlauf des Meßsignals für eine Leerwertkorrektur (1'-4'); .
- 10 Abb. 3 den zeitlichen Verlauf des Meßsignals bei einer α -Amylasebestimmung in Proben mit unterschiedlichen Gehalten an Hämoglobinderivat ohne Zusatz einer peroxidischen Verbindung;
- 15 Abb. 4 die zeitlichen Verlauf des Meßsignals bei einer α -Amylase Bestimmung in Proben mit unterschiedlichen Gehalten an Hämoglobinderivat unter Zusatz einer peroxidischen Verbindung (1-4) bzw. den zeitlichen Verlauf des Signals für eine Leerwertkorrektur (1'-4'); .
- 20 Abb. 5 den zeitlichen Verlauf des Meßsignals bei einer Bestimmung von γ -GT in Proben mit unterschiedlichen Gehalten an Hämoglobinderivat ohne Zusatz einer peroxidischen Verbindung;
- 25 Abb. 6 den zeitlichen Verlauf des Meßsignals bei einer γ -GT Bestimmung in Proben mit unterschiedlichen Gehalten an HB-Derivat unter Zusatz einer peroxidischen Verbindung (1-7) und
- Abb. 7 den zeitlichen Verlauf des Signals für eine parallel zu den Versuchen in Abb. 6 durchgeführten Leerwertkorrektur (1'-7').
- 30

BEISPIELE**Beispiel 1:**

- 5 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (AP) in Hämoglobin-derivat-haltigem Serum

1.1. Probenmaterial:

- 10 Je 0,40 ml eines Humanserumpools werden mit 0,01 - 0,10 ml Hämoglobin-Derivat (di-aspirin crosslinked hemoglobin, 'DClHb', 10 g/dl; Fa. Baxter) in Stufen von 0,01 ml aufgestockt und zum Volumenausgleich mit 0,9 % NaCl-Lösung auf jeweils 0,50 ml aufgefüllt (DClHb-Konzentration 200 - 2.000
15 mg/dl).

Als Kontrolle wird eine Mischung von 0,40 ml des selben Serumpools mit 0,10 ml 0,9 %iger wäßriger NaCl-Lösung mitgeführt.

20 **1.2. Reagenzien:**

1.2.1. Alkalische Phosphatase-Grundreagenz (entsprechend Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie):

- 25 AP DGKCh (Sys 2-Packung, Boehringer Mannheim GmbH, Best.-Nr. 1 662 902); Zusammensetzung:

R1:	D(-)-N-Methylglucamin·HCl (pH 10,1)	610 mmol/l
	Mg-Acetat	0,61 mmol/l
30	NaCl	85,4 mmol/l

R2: 4-Nitrophenylphosphat 122 mmol/l

1.2.2. Alkalische Phosphatase-Reagenz mit Peroxid-Zusatz:

35

Wie 1.2.1., nur daß zu R1 noch H₂O₂ zu einer Konzentration von 147 mmol/l zugesetzt wird (0,5 ml Perhydrol 30 %ig pro 30 ml

- 10 -

R1) (H_2O_2 -Endkonzentration im Test = 120 mmol/l).

1.3. Durchführung der Bestimmung:

- 5 Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase wurde am Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysenautomat bei 37 °C mit Geräteeinstellungen gemäß der Arbeitsvorschrift der Packungsbeilage durchgeführt (5 μl Probe, 250 μl R1, 50 μl R2; Wellenlängen 700/405 nm; Meßintervall 30. - 38. Meßpunkt).

10

1.4. Ergebnisse:

1.4.1. Reaktionskinetik (zeitlicher Extinktionsverlauf):

- 15 Abb. 1 zeigt den zeitlichen Extinktionsverlauf im Alkalische Phosphatase-Test bei Verwendung des Grundreagenzes (1.2.1) und folgender Proben:

- Kurve 1: 0,9 % NaCl (= Reagenzleerwert)
- 20 - Kurve 2: Serum ohne DCLHb
- Kurve 3: Serum mit 1.000 mg/dl DCLHb
- Kurve 4: Serum mit 2.000 mg/dl DCLHb

Zumindest mit dem Serum mit einem DCLHb-Gehalt von 2.000 mg/dl
25 wird mit ca. 2.3 eine Ausgangsextinktion erreicht, die an der photmetrischen Erfassungsgrenze liegt und keine zuverlässige Bestimmung der Enzymaktivität mehr erlaubt.

Dagegen führt, wie aus Abb. 2 ersichtlich (Zuordnung der Ex-
30 tinktionsverläufe zu den verschiedenen Proben wie bei Abb. 1), die Anwesenheit von Peroxid in R1 des Alkalische Phosphatase-Reagenzes zu einer raschen Absenkung der vom Hämoglobin-Derivat verursachten Ausgangsextinktion, so daß zu Beginn des Meßintervalls (Meßpunkt 30) auch bei dem auf 2.000 mg/dl mit
35 DCLHb aufgestockten Serum eine Anfangsextinktion von weniger als 0,2 erreicht wird. Eine der Farbbildung aus dem chromogenen Substrat im Meßintervall evtl. noch unterlagerte weitere

Hämoglobin-Ausbleichung läßt sich durch Mitführen eines separaten Reaktionsansatzes mit chromogenfreiem R2 (= R1 aus dem Grundreagenz) ermitteln und bei der Berechnung der AP-Aktivität in Korrektur bringen (Kurven 1' - 4' der Abb. 2).

1.4.2. Alkalische Phosphatase-Wiederfindung:

In nachfolgender Tabelle sind die Daten zur Wiederfindung der Alkalischen Phosphatase in dem mit unterschiedlichen DClHb-Mengen aufgestockten Serum-Pool bei Verwendung (a) des herkömmlichen AP-Reagenzes und (b) des mit H_2O_2 in R1 versetzten AP-Reagenzes aufgelistet:

		Wiederfindung Alkalische Phosphatase*					
		Reagenz ohne H_2O_2 -Zusatz		Reagenz mit H_2O_2 -Zusatz			
Proben-Nr.	DClHb-Konzentration (mg/dl)			ohne Leerwertkorrektur		mit Leerwertkorrektur	
		U/l	%	U/l	%	U/l	%
1	0	275	(100)	272	99	272	99
2	200	254	92	272	99	273	99
3	400	239	87	268	98	270	98
4	600	232	84	265	96	269	98
5	800	216	78	262	95	267	97
6	1.000	200	73	262	95	268	98
7	1.200	188	68	259	94	267	97
8	1.400	176	64	262	95	272	99
9	1.600	162	59	258	94	268	98
10	1.800	146	53	257	94	271	99
11	2.000	139	50	249	91	262	95

*) Kalibration der Tests jeweils mit Calibrator for Automated Systems, Boehringer Mannheim GmbH, Best.-Nr. 759 350

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die Wiederfindung der Alkalischen Phosphatase mit dem herkömmlichen Analysenreagenz mit steigender Probenkonzentration an Hämoglobin-Derivat erhe-

blich abnimmt, während sie mit dem erfindungsgemäßen Peroxid-Zusatz auch bei 2.000 mg DCLHb/dl noch bei über 90 % (Berechnung ohne Leerwertkorrektur) bzw. ≥ 95 % (Berechnung mit Leerwertkorrektur) liegt.

5

Identische Ergebnisse werden auch erhalten, wenn der Serumpool anstelle von DCLHb mit dem Hämoglobin-Derivat der Fa. Somatogen (rekombinantes Human-Hämoglobin aus E. coli mit intramolekularer di- α -Fusion) aufgestockt wird.

10

Das Resultat ändert sich auch nicht, wenn R1 anstelle von H_2O_2 als Peroxid Natrium-Perborat ($NaBO_2 \cdot H_2O_2 \cdot 3 H_2O$) zugesetzt wird; z.B. wurden bei Perborat-Konzentrationen von 14,4 bzw. 28,8 mmol/l R1 (Endkonzentration im Test = 11,8 bzw. 23,6 mmol/l)

15 folgende AP-Wiederfindungen gemessen:

Probe	DCLHb-Gehalt (mg/dl)	Wiederfindung Alkalische Phosphatase (%)		
		R1 ohne Perborat	R1 mit Perborat, 14,4 mmol/l	R1 mit Perborat, 28,8 mmol/l
20 1	0	(100)	103*	103*
2	2.000	67	101*	102*

*)korrigiert über Abzug des kinetischen Leerwerts (Test-
25 ansatz mit chromogenfreiem R2)

Schließlich werden auch keine davon abweichenden Ergebnisse erhalten, wenn R2 zum Peroxidabbau z.B. noch Katalase zugesetzt wird.

30

Beispiel 2:

Bestimmung der α -Amylase in Hämoglobinderivat-haltigem Serum

2.1. Probenmaterial:

Art und Herstellung s. Beispiel 1, Punkt 1.1.

5 2.2. Reagenzien:

2.2.1. Amylase-Grundreagenz:

α -Amylase EPS liquid (Sys 2-Packung, Boehringer Mannheim GmbH,
10 Kat.-Nr. 1555 693); Zusammensetzung:

R1:	α -Glucosidase	≥ 4 U/ml
	HEPES-Puffer (pH 7,15)	52,5 mmol/l
	NaCl	87,0 mmol/l
15	MgCl ₂	12,6 mmol/l
R2:	4,6-Ethyliden-G7 PNP	22,0 mmol/l
	HEPES-Puffer (pH 7,15)	52,5 mmol/l

20 2.2.2. Amylase-Reagenz mit Peroxid-Zusatz:

Wie 2.2.1, nur daß R1 noch H₂O₂ auf eine Konzentration von 147 mmol/l zugesetzt wird (0,5 ml Perhydrol 30 %ig pro 30 ml R1) (H₂O₂ -Endkonzentration im Test = 118 mmol/l).

25

2.3. Durchführung der Bestimmung:

Die Amylase-Bestimmung wurde am Boehringer Mannheim/Hitachi 717-Analysenautomat bei 37°C mit Geräteeinstellungen gemäß der
30 Arbeitsvorschrift der Packungsbeilage durchgeführt (10 μ l Probe, 250 μ l R1, 50 μ l R2; Wellenlängen 700/405 nm; Meßintervall 40. -50. Meßpunkt).

2.4. Ergebnisse:

35

2.4.1. Reaktionskinetik (zeitlicher Extinktionsverlauf):

Abb. 3 zeigt den zeitlichen Extinktionsverlauf im Amylase-Test bei Verwendung des Grundreagenzes (2.2.1) und folgenden Proben:

- 5 - Kurve 1: 0,9 % NaCl (= Reagenzleerwert)
 - Kurve 2: Serum ohne DClHb
 - Kurve 3: Serum mit 1.000 mg/dl DClHb
 - Kurve 4: Serum mit 2.000 mg/dl DClHb
- 10 Aus Abb. 3 ist zu ersehen, daß schon bei einer DClHb-Konzentration von 1.000 mg/dl im herkömmlichen Amylase-Test eine Grundextinktion von mehr als 2 erreicht wird, während bei der mit DClHb zu 2.000 mg/dl aufgestockten Probe der Meßbereich des Photometers überschritten wird und somit eine Bestimmung
15 der Amylase völlig unmöglich ist.

Dagegen führt, wie aus Abb. 4 ersichtlich (Zuordnung der verschiedenen Extinktionsverläufe zum Probenmaterial wie bei Abb. 3), der Zusatz von Peroxid zu R1 des Amylase-Reagenzes zu
20 einer raschen Absenkung der vom Hämoglobin-Derivat verursachten Ausgangsextinktion, so daß zu Beginn des Meßintervalls (Meßpunkt 40) auch bei dem auf 2.000 mg/dl mit DClHb aufgestockten Serum eine Anfangsextinktion von nur ca. 0,3 erreicht wird. Analog der AP-Bestimmung empfiehlt es sich auch hier,
25 zur Erfassung einer weiteren Hämoglobin-Ausbleichung im Meßfenster einen separaten Reaktionsansatz mit chromogenfreiem R2 (= R1 aus dem Grundreagenz) mitzuführen und bei der Berechnung der Amylase-Aktivität in Korrektur zu bringen (Kurven 1' - 4' der Abb. 4).

30

2.4.2. Amylase-Wiederfindung:

In nachfolgender Tabelle sind die Daten zur Amylase-Wiederfindung in dem mit unterschiedlichen DClHb-Mengen aufgestock-
35 ten Serum-Pool bei Verwendung (a) des herkömmlichen Amylase-Reagenzes und (b) des gleichen, jedoch mit H₂O, in R1 versetzten Amylase-Reagenzes aufgelistet:

Proben Nr.	DClHb-Konzentration (mg/dl)	Wiederfindung Amylase*			
		Reagenz ohne H ₂ O ₂ -Zusatz		Reagenz mit H ₂ O ₂ -Zusatz**	
		U/l	%	U/l	%
1	0	122	(100)	119	98
2	200	95	78	114	93
3	400	79	65	120	98
4	600	84	69	117	96
5	800	76	62	115	94
6	1.000	83	68	113	93
7	1.200	88	72	117	95
8	1.400	86	71	114	93
9	1.600	69	57	112	92
10	1.800	65	53	111	91
11	2.000	- 13	- 11	112	92

*) Kalibration der Tests jeweils mit Calibrator for Automated Systems, Boehringer Mannheim GmbH, Best.-Nr. 759 350

**) korrigiert über Abzug des kinetischen Leerwerts (Testansatz mit chromogenfreiem R2)

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die Amylase-Wiederfindung mit dem herkömmlichen Reagenz bei steigender DClHb-Konzentration abnimmt und bei 2.000 mg/dl sogar negative Werte erreicht, während sie durch den erfindungsgemäßen Peroxid-Zusatz immer über 90 % beträgt.

Im übrigen gelten die für die AP-Bestimmung gemachten Aussagen analog.

Beispiel 3:

Bestimmung der γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT) in Hämoglobin-derivat-haltigem Serum.

3.1. Probenmaterial:

Art und Herstellung s. Beispiel 1, Punkt 1.1.

3.2. Reagenzien:

3.2.1. γ -GT-Grundreagenz:

Gamma-GT (Sys 2-Packung, Boehringer Mannheim GmbH, Best.-Nr. 1
10 489 496); Zusammensetzung:

R1:	NaOH	76 mmol/l
	Glycylglycin	150 mmol/l
	(pH 7,7)	

15 R2: L- γ -Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid 6 mmol/l R1

3.2.2. γ -GT-Reagenz mit Peroxid-Zusatz:

Wie 3.2.1, nur daß zu R1 noch H_2O_2 auf eine Konzentration von
20 147 mmol/l gegeben wird (0,5 ml Perhydrol 30 %ig pro 30 ml
R1) (H_2O_2 -Endkonzentration im Test = 116 mmol/l).

3.3. Durchführung der γ -GT-Bestimmung:

25 Die γ -GT-Bestimmung wurde am Boehringer Mannheim/Hitachi 717-
Analysenautomat bei 37°C mit Geräteeinstellungen gemäß der
Arbeitsvorschrift der Packungsbeilage durchgeführt (15 μ l
Probe, 250 μ l R1, 50 μ l R2; Wellenlängen 660/405 nm; Meßinter-
vall 30. - 50 Meßpunkt).

30

3.4. Ergebnisse:

3.4.1. Reaktionskinetik (zeitlicher Extinktionsverlauf):

35 Abb. 5 zeigt den zeitlichen Extinktionsverlauf im γ -GT-Test
bei Verwendung des Grundreagenzes (3.2.1) und folgenden Pro-
ben:

- Kurve 1: 0,9 % NaCl (= Reagenzleerwert)
- Kurve 2: Serum ohne DClHb
- Kurve 3: Serum mit 400 mg DClHb/dl
- Kurve 4: Serum mit 800 mg DClHb/dl
- 5 - Kurve 5: Serum mit 1.200 mg DClHb/dl
- Kurve 6: Serum mit 1.600 mg DClHb/dl
- Kurve 7: Serum mit 2.000 mg DClHb/dl

Aus Abb. 5 ist zu ersehen, daß schon bei einer DClHb-Konzentration von 800 mg/dl im herkömmlichen γ -GT-Test eine Grundextinktion von mehr als 2 erreicht wird, während bei den mit DClHb auf mehr als 1.600 mg/dl aufgestockten Proben der Meßbereich des Photometers überschritten wird und somit von vorneherein keine Bestimmung der γ -GT mehr möglich ist.

15 Dagegen führt, wie aus Abb. 6 ersichtlich (Zuordnung der Extinktionsverläufe zu den verschiedenen Proben wie bei Abb. 5), die Anwesenheit von Peroxid in R1 des γ -GT-Reagenzes zu einer raschen Absenkung der vom Hämoglobin-Derivat verursachten Ausgangsextinktion, so daß zu Beginn des Meßintervalls (Meßpunkt 20 30) auch bei dem auf 2.000 mg/dl mit DClHb aufgestockten Serum eine Anfangsextinktion von nur knapp mehr als 1 erreicht wird.

Der dem von der Umsetzung des chromogenen Substrats herrührenden Farbsignal noch unterlagerte weitere Hämoglobin-Ausbleicheffekt läßt sich auch hier, analog Beispielen 1 und 2, in einem parallelen Testansatz mit H_2O_2 -haltigem R1 und mit R1 des Grundreagenzes als chromogenfreiem R2 ermitteln (Kurven 1' - 7' der Abb. 7) und bei der Berechnung für die γ -GT-Wiederfindung berücksichtigen.

2.4.2. γ -GT-Wiederfindung:

In nachfolgender Tabelle sind die Daten zur γ -GT-Wiederfindung in dem mit unterschiedlichen DClHb-Mengen aufgestockten Serum-Pool bei Verwendung (a) des herkömmlichen γ -GT-Reagenzes und 35 (b) des mit H_2O_2 in R1 versetzten γ -GT-Reagenzes aufgelistet:

Proben-Nr.	DClHb-Konzentration (mg/dl)	Wiederfindung γ -GT*			
		Reagenz ohne H ₂ O ₂ -Zusatz		Reagenz mit H ₂ O ₂ -Zusatz**	
		U/l	%	U/l	%
1	0	53,3	(100)	52,3	98
2	200	31,9	60	49,6	93
3	400	17,0	32	48,2	90
4	600	- 1,7	- 3	49,8	93
5	800	- 9,1	- 17	48,5	91
6	1.000	- 24,8	- 47	48,1	90
7	1.200	- 30,0	- 56	49,4	93
8	1.400	- 30,1	- 56	51,9	97
9	1.600	- 9,5	- 18	51,8	97
10	1.800	- 10,4	- 19	50,0	94
11	2.000	- 10,3	- 19	50,8	95

*) Kalibration der Tests jeweils mit Calibrator for Automated Systems, Boehringer Mannheim GmbH, Best.-Nr. 759 350

**) korrigiert über Abzug des kinetischen Leerwerts (Testansatz mit chromogenfreiem R2)

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die γ -GT-Wiederfindung mit dem herkömmlichen Reagenz mit steigender DClHb-Konzentration sehr schnell absinkt und bereits ab 600 mg/dl sogar negative Werte annimmt, während sie beim Reagenz mit dem erfindungsgemäßen Peroxid-Zusatz immer ≥ 90 % beträgt.

Bezüglich der Ergebnisse mit dem Hämoglobinderivat der Fa. Somatogen, dem Einsatz von Natrium-Perborat anstelle von H₂O₂ sowie dem fakultativen Zusatz von Katalase zu R2 gelten im übrigen hierfür die AP-Bestimmung gemachten Angaben analog.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Beseitigung oder/und Verminderung von Störungen, die durch Anwesenheit von freiem Hämoglobin hervorgerufen werden, bei der Bestimmung eines Analyten in einer Probe durch optische Messung,
dadurch gekennzeichnet,
daß man dem zur Bestimmung des Analyten verwendeten Reagenz oder einem Teil davon eine oder mehrere peroxidische Verbindungen zusetzt.
2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man anorganische peroxidische Verbindungen verwendet.
3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die peroxidischen Verbindungen ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus H_2O_2 und Perboraten.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die optische Messung bei mindestens einer Meßwellenlänge durchführt, bei der Hämoglobin eine Absorption aufweist.
5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die optische Messung bei Meßwellenlängen von 380-450 nm oder/und 520-590 nm durchführt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen Analyten bestimmt, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus α -Amylase, Alkalischer Phosphatase und γ -Glutamyl-Transferase.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Endkonzentration der peroxidischen Verbindungen
im Testansatz 1 - 500 mmol/l bezogen auf den Gehalt an
O₂²⁻ beträgt.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Endkonzentration 5 - 200 mmol/l beträgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Einwirkungszeit der peroxidischen Verbindungen
auf die Probe vor der Messung mindestens 1 Minute be-
trägt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bestimmung als Mehr-Schritt-Test durchgeführt
wird, wobei der Probe mindestens zwei Teilreagenzien zu
unterschiedlichen Zeitpunkten zugesetzt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß die peroxidischen Verbindungen mit dem ersten Teil-
reagenz zugesetzt werden.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Probe bestimmt, die ein Blutersatzmittel
enthält.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bestimmung an einer Serum- oder Plasmaprobe
durchgeführt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Bestimmung in einem Analyseautomaten durch-
führt.
- 5 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das bei der Analytenbestimmung erhaltene Meßsi-
gnal einer Leerwertkorrektur unterzieht.
- 10 16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß man vom Meßsignal den kinetischen Leerwert abzieht.
- 15 17. Reagenzienkit zur Bestimmung eines Analyten in einer
Probe durch optische Messung,
dadurch gekennzeichnet,
daß er neben den zur Analytbestimmung erforderlichen
Komponenten mindestens eine peroxidische Verbindung zur
20 Beseitigung oder/und Verminderung von Störungen, die
durch freies Hämoglobin hervorgerufen werden, enthält.
18. Reagenzienkit nach Anspruch 17,
dadurch gekennzeichnet,
25 daß er aus mindestens zwei räumlich voneinander getrenn-
ten Teilreagenzien besteht, wobei ein Teilreagenz die
peroxidische Verbindung und das oder die anderen Teilrea-
genzien weitere Testkomponenten enthalten.
- 30 19. Reagenzienkit nach Anspruch 17 oder 18, zur Bestimmung
von α -Amylase, umfassend ein erstes Teilreagenz, das eine
peroxidische Verbindung enthält, ein zweites Teilreagenz,
das einen geeigneten Puffer und gegebenenfalls ein α -Amy-
lase-Hilfsenzym oder/und einen Antikörper enthält, und
35 ein weiteres Teilreagenz, das ein chromogenes α -Amyla-
sesubstrat enthält.

20. Reagenzienkit nach Anspruch 17 oder 18, zur Bestimmung von Alkalischer Phosphatase, umfassend ein erstes Teilreagenz, das eine peroxidische Verbindung enthält, ein zweites Teilreagenz, das einen geeigneten Puffer enthält und ein weiteres Teilreagenz, das ein chromogenes Substrat der Alkalischen Phosphatase enthält.
21. Reagenzienkit nach Anspruch 17 oder 18 zur Bestimmung von γ -Glutamyl-Transferase, umfassend ein erstes Teilreagenz, das eine peroxidische Verbindung enthält, ein zweites Teilreagenz, das einen geeigneten Puffer enthält und ein weiteres Teilreagenz, das ein chromogenes Substrat der γ -Glutamyl-Transferase enthält.
22. Verwendung von peroxidischen Verbindungen zur Beseitigung oder/und Verminderung von Störungen, die durch freies Hämoglobin hervorgerufen werden, bei der Bestimmung eines Analyten in einer Probe.

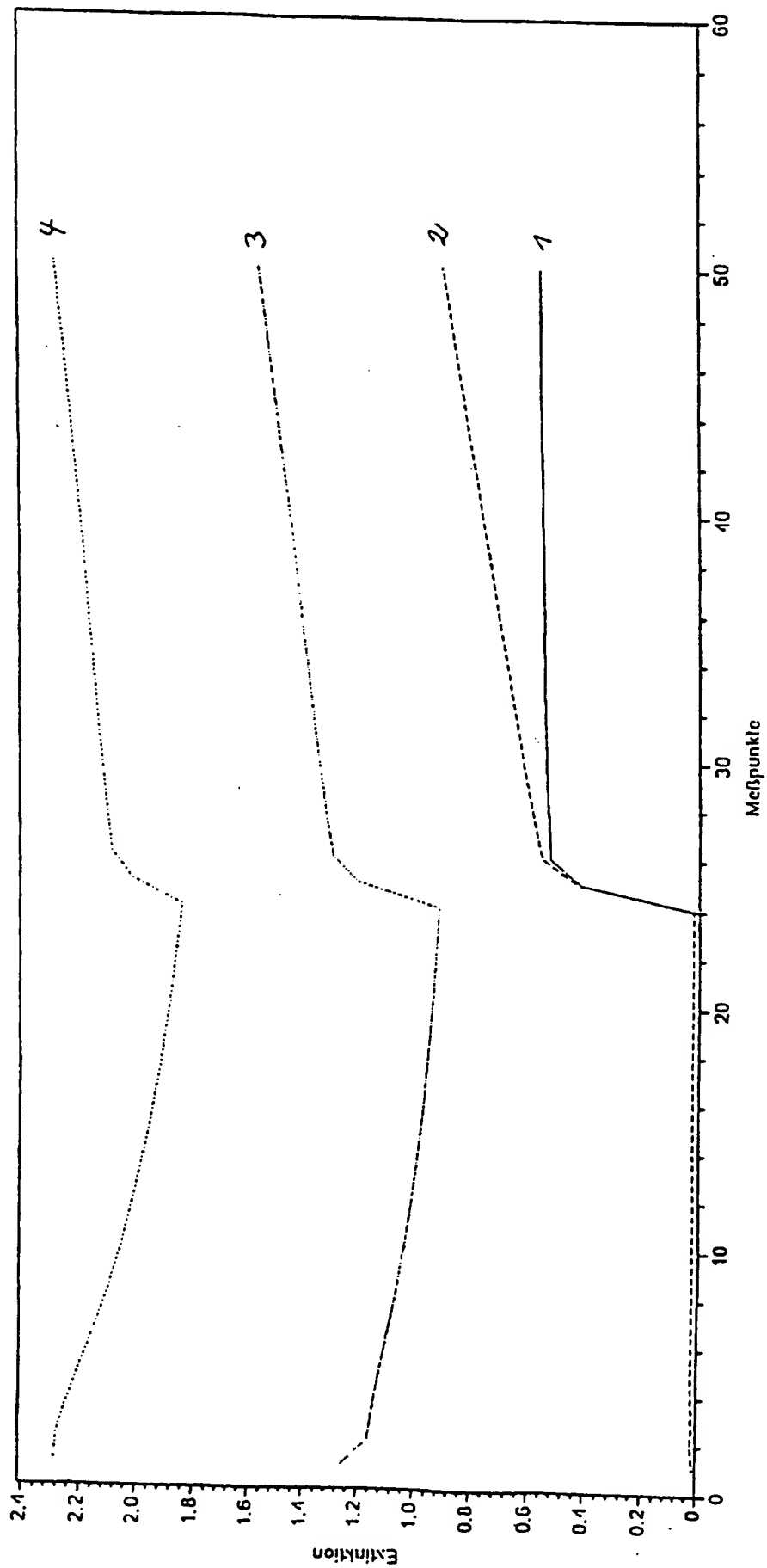


Abb. 1

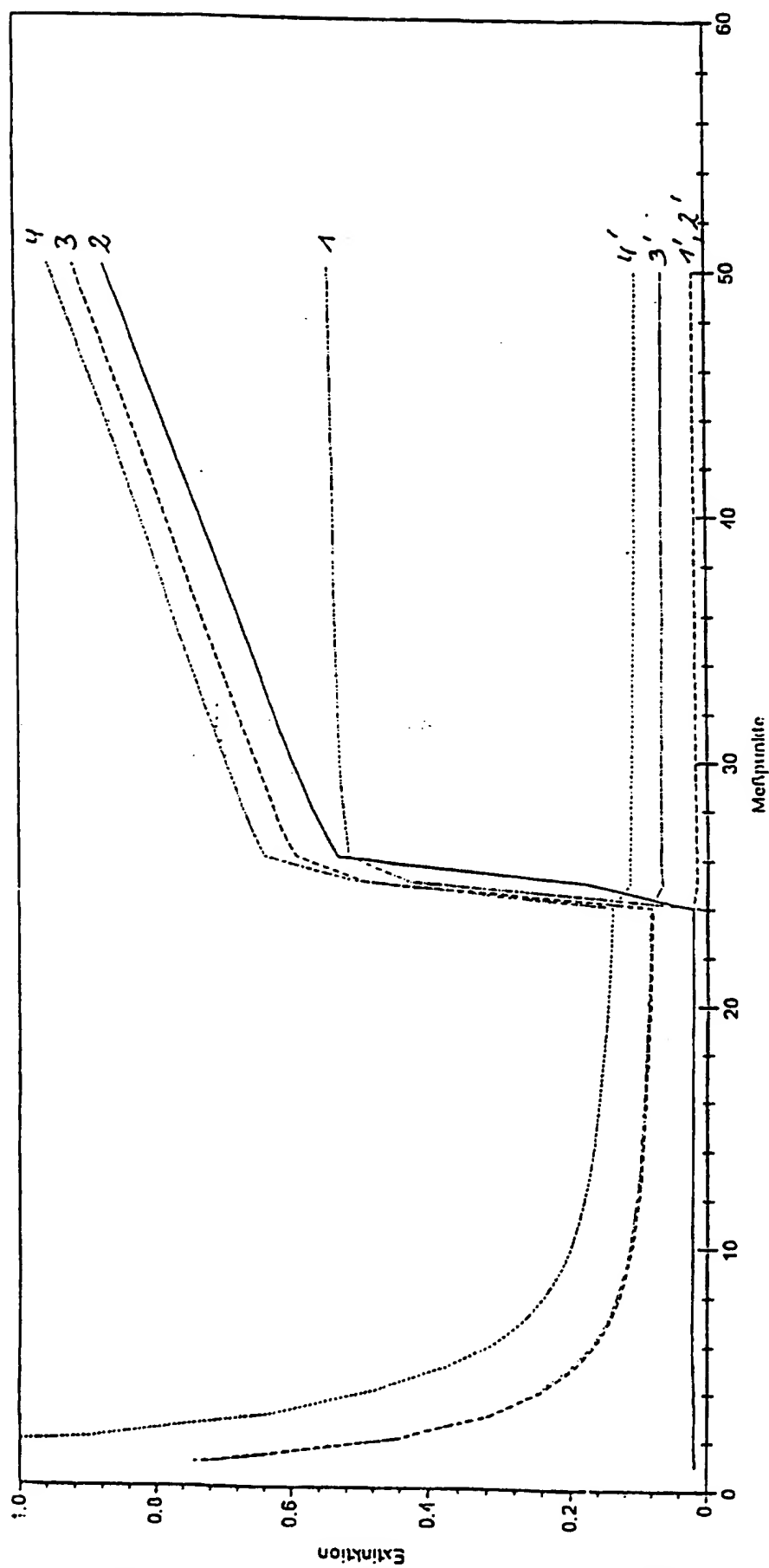


Abb. 2

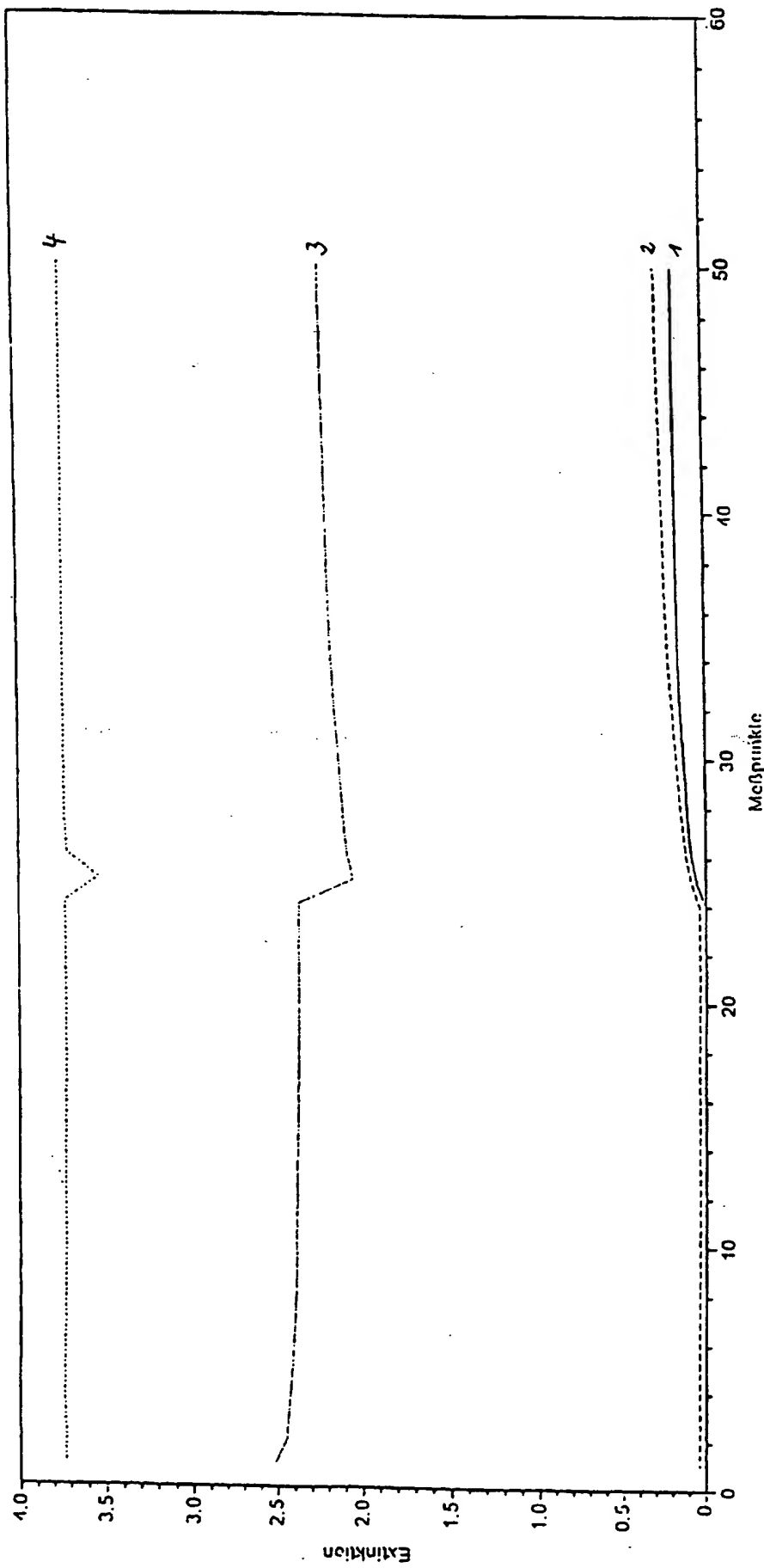


Abb. 3

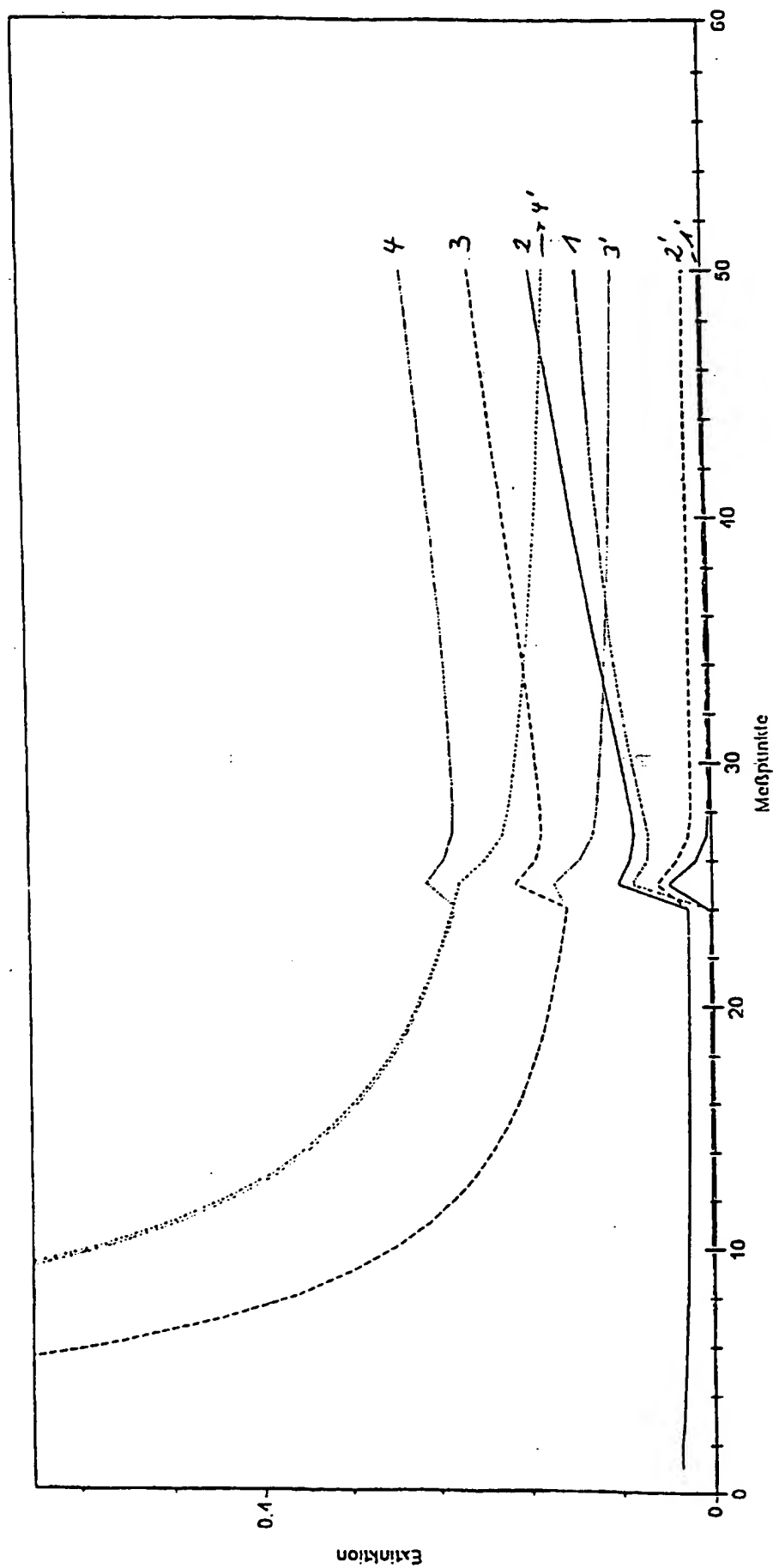


Abb. 4

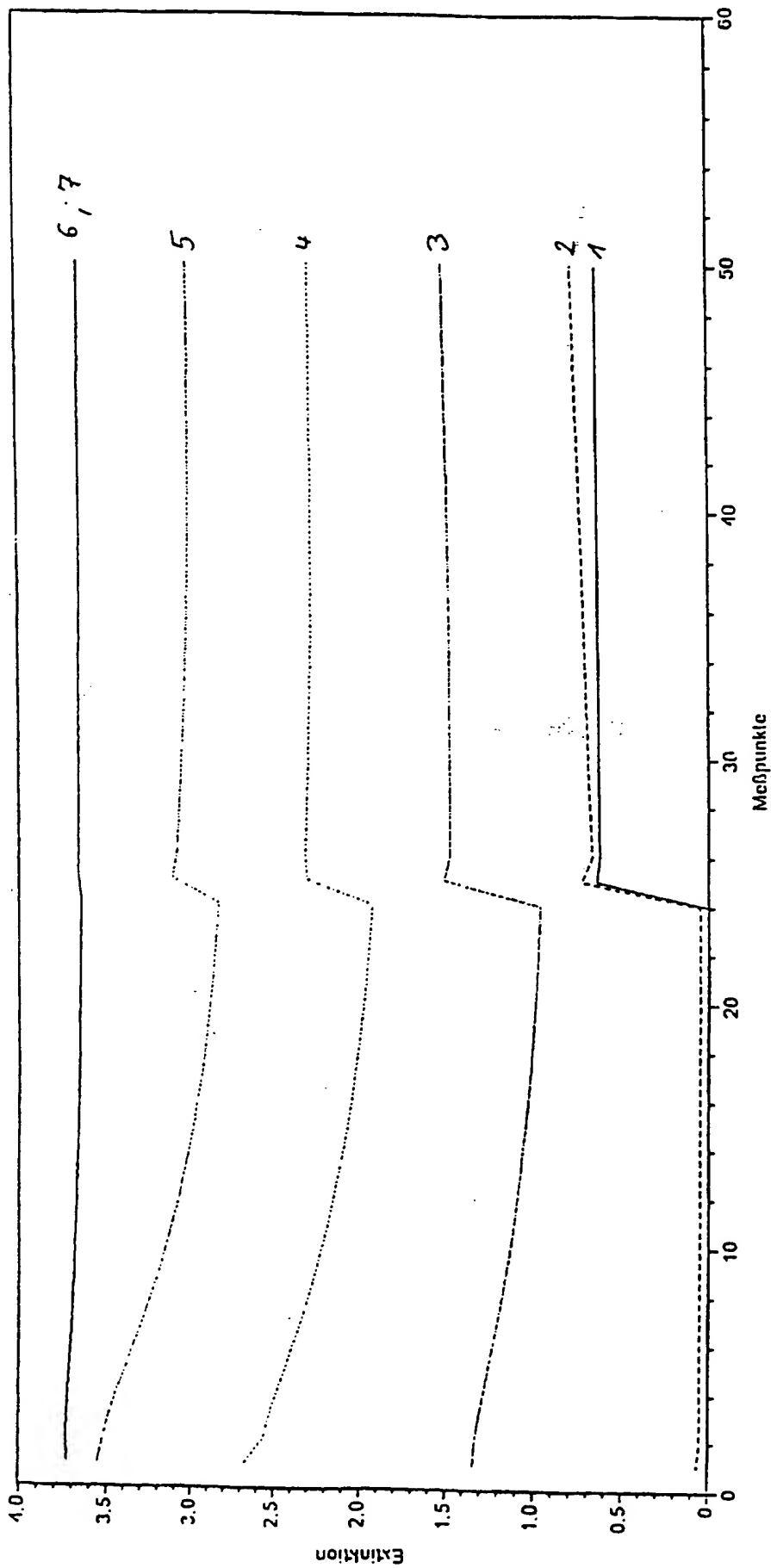


Abb. 5

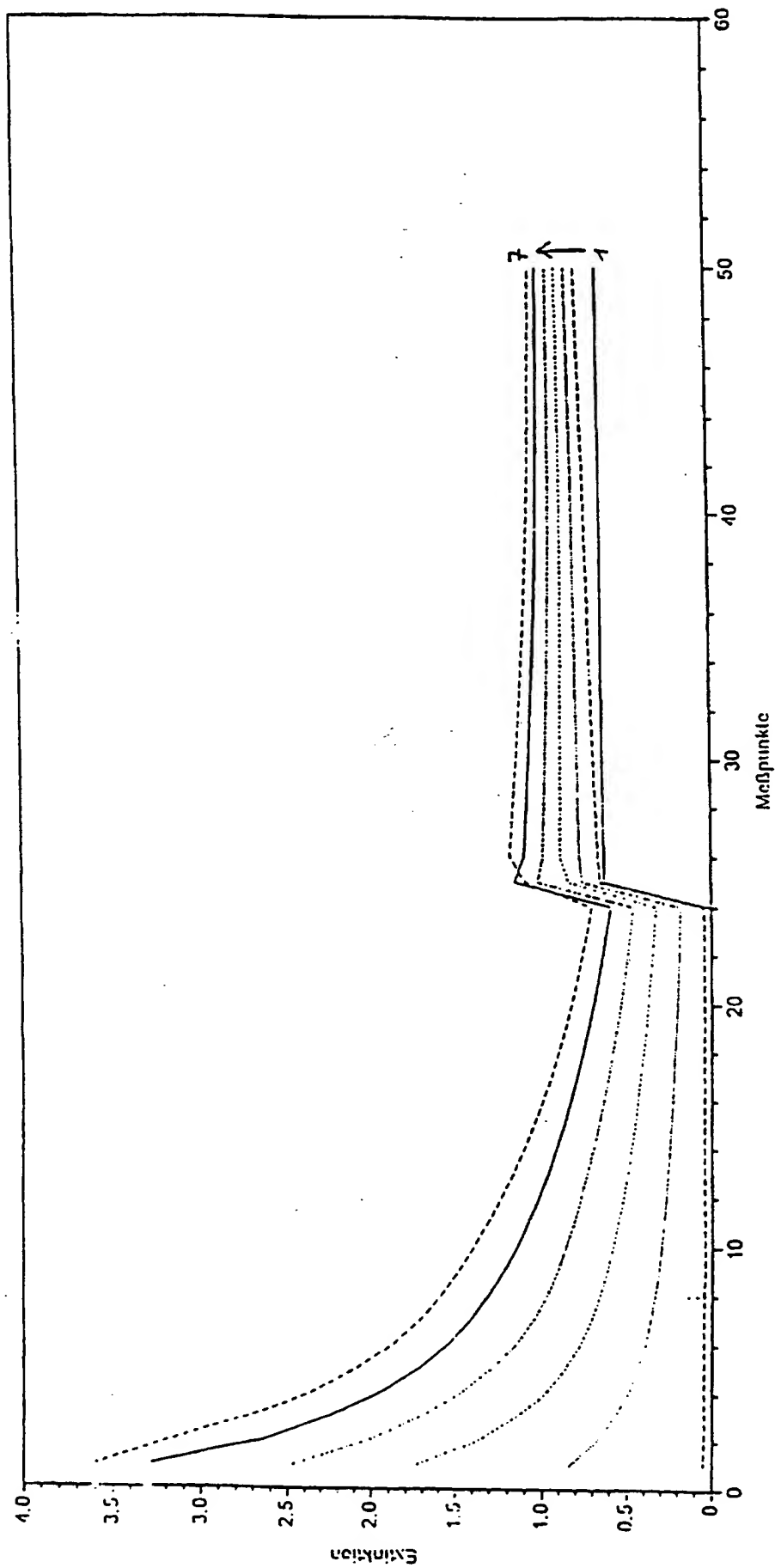


Abb. 6

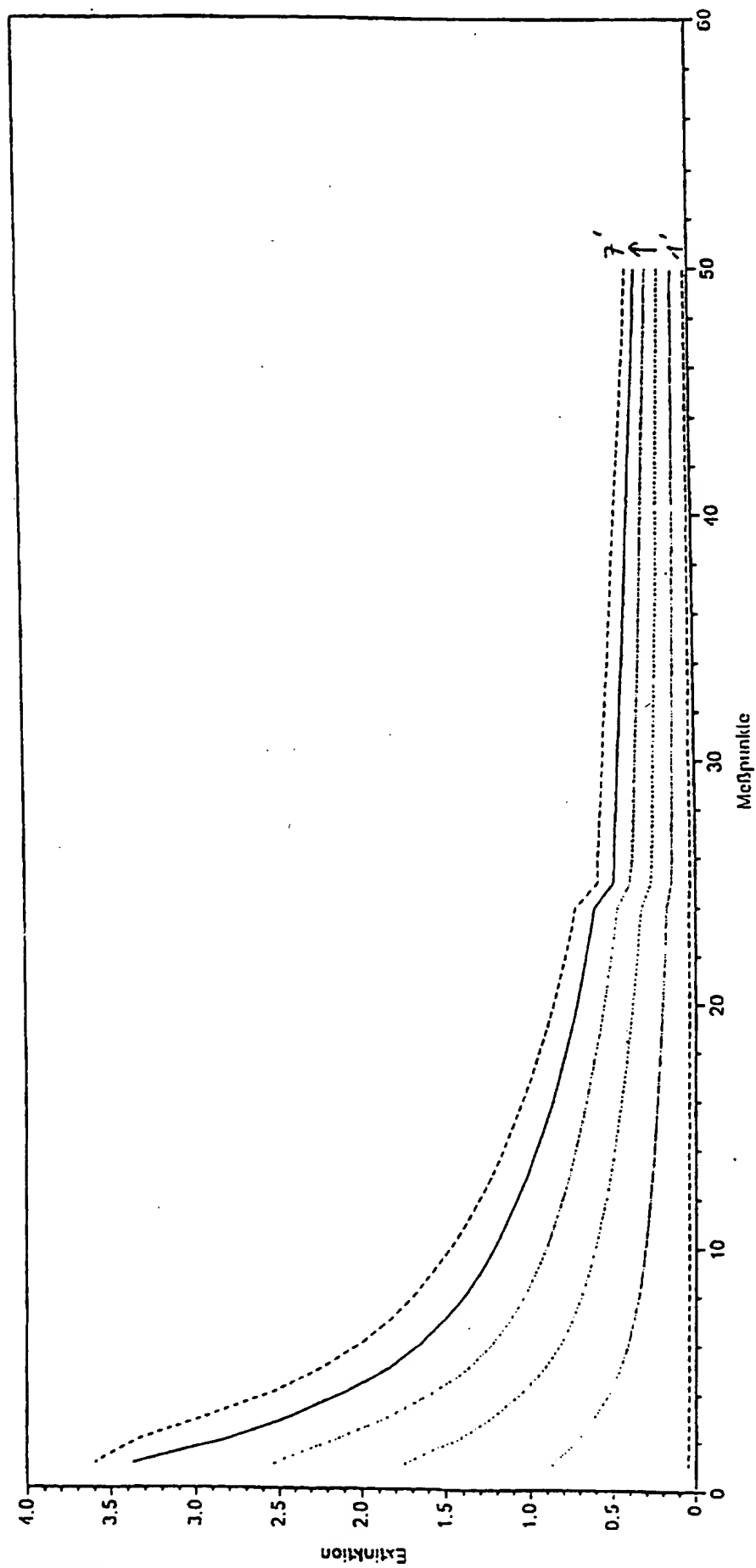


Abb. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 97/03750

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/40 C12Q1/42 C12Q1/00 C12Q1/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q GOIN

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 693 552 A (JOHNSON & JOHNSON CLIN DIAG) 24 January 1996 see claims 1,16 see page 3, line 43 - line 44 see page 6, line 26 - line 28 ---	1-22
X	WO 90 02202 A (CETUS CORP) 8 March 1990 see claims 1-18,50,57 see page 4, line 16 - line 30 see page 5, line 5 - page 6, line 9 see page 17, line 8 - line 26 ---	1-22
X	WO 86 07462 A (AMERSHAM INT PLC) 18 December 1986 see claims 1,5,7-9 see page 3, line 35 - page 5, line 10 ---	1-22
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 December 1997

Date of mailing of the international search report

17/12/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Routledge, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 97/03750

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 978 632 A (MACH PATRICK A ET AL) 18 December 1990 see claims 1-9 see column 1, line 44 - line 51 ---	1-22
X	US 4 252 783 A (KAM JEAN ET AL) 24 February 1981 see claims 1-9 see column 1, line 41 - line 50 see column 3, line 21 - line 25 -----	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/EP 97/03750

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0693552 A	24-01-96	AU 2492695 A CA 2154013 A JP 8170961 A	01-02-96 20-01-96 02-07-96
WO 9002202 A	08-03-90	NONE	
WO 8607462 A	18-12-86	EP 0223816 A JP 62502633 T	03-06-87 08-10-87
US 4978632 A	18-12-90	AT 127922 T CA 1338999 A DE 68924272 D DE 68924272 T DK 115091 A EP 0449812 A WO 9007115 A	15-09-95 18-03-97 19-10-95 21-03-96 12-08-91 09-10-91 28-06-90
US 4252783 A	24-02-81	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. les Aktenzeichen

PCT/EP 97/03750

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/40 C12Q1/42 C12Q1/00 C12Q1/48

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoffgehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 693 552 A (JOHNSON & JOHNSON CLIN DIAG) 24. Januar 1996 siehe Ansprüche 1, 16 siehe Seite 3, Zeile 43 - Zeile 44 siehe Seite 6, Zeile 26 - Zeile 28	1-22
X	WO 90 02202 A (CETUS CORP) 8. März 1990 siehe Ansprüche 1-18, 50, 57 siehe Seite 4, Zeile 16 - Zeile 30 siehe Seite 5, Zeile 5 - Seite 6, Zeile 9 siehe Seite 17, Zeile 8 - Zeile 26	1-22
X	WO 86 07462 A (AMERSHAM INT PLC) 18. Dezember 1986 siehe Ansprüche 1, 5, 7-9 siehe Seite 3, Zeile 35 - Seite 5, Zeile 10	1-22

	--- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Dezember 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

17/12/1997

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Routledge, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. des Aktenzeichen

PCT/EP 97/03750

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 4 978 632 A (MACH PATRICK A ET AL) 18.Dezember 1990 siehe Ansprüche 1-9 siehe Spalte 1, Zeile 44 - Zeile 51 ---	1-22
X	US 4 252 783 A (KAM JEAN ET AL) 24.Februar 1981 siehe Ansprüche 1-9 siehe Spalte 1, Zeile 41 - Zeile 50 siehe Spalte 3, Zeile 21 - Zeile 25 -----	1-22

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 97/03750

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0693552 A	24-01-96	AU 2492695 A CA 2154013 A JP 8170961 A	01-02-96 20-01-96 02-07-96
WO 9002202 A	08-03-90	KEINE	
WO 8607462 A	18-12-86	EP 0223816 A JP 62502633 T	03-06-87 08-10-87
US 4978632 A	18-12-90	AT 127922 T CA 1338999 A DE 68924272 D DE 68924272 T DK 115091 A EP 0449812 A WO 9007115 A	15-09-95 18-03-97 19-10-95 21-03-96 12-08-91 09-10-91 28-06-90
US 4252783 A	24-02-81	KEINE	